

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/87333 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/145 (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, 10315 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01939 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Mai 2001 (17.05.2001) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 25 045.9 18. Mai 2000 (18.05.2000) DE
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: VON BAEHR, Rüdiger [DE/DE]; Maerkisches Ufer 22, 10179 Berlin (DE). VON BAEHR, Volker [DE/DE]; Neue Gruenstrasse 11, 10179 Berlin (DE).
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: IMMUNE SYSTEM STIMULATING MEANS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR STIMULATION DES IMMUNSYSTEMS

WO 01/87333 A2

(57) **Abstract:** The invention relates to means for stimulating the immune system as well as the use of proteins to fight against influenza (influenza vaccine) in order to promote deficient immune defense through T-cells stimulation. According to the invention, said means are used for immune stimulation, preferably in domains such as tumor therapy or antiretroviral therapy in case of HIV infection, in order to enhance infection resistance and to increase antitumoral response, to stimulate and promote NK cells, to increase the synthesis activity of immunologically active cytokines and to augment T-cell system performance.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Mittel zur Stimulation des Immunsystems und die Verwendung von Influenzaproteinen (Grippeimpfstoff) zur Aktivierung einer defizitären Immunabwehr durch eine Stimulation von T-Lymphozyten. Die erfindungsgemäßen Mittel werden im Sinne einer Immunstimulation vorzugsweise auf den Gebieten Tumorthherapie oder HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie, zur Verbesserung der Infektoresistenz und zur Erhöhung der antitumoralen Reaktion, zur Stimulierung und Aktivierung von NK-Zellen, zur Erhöhung der Syntheseaktivität für immunologisch wichtige Zytokine sowie der Leistungsfähigkeit des T-lymphozytären Systems eingesetzt.

Mittel zur Stimulation des Immunsystems

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein neues Mittel zur unspezifischen Stimulation des Immunsystems und die Verwendung von Proteinen aus Influenzaviren zur Herstellung von Mitteln zur Stimulation des Immunsystems. Dabei werden Proteine des Influenzavirus, wie sie in Influenzaimpfstoffen enthalten sind, verwendet.

- 10 Bei dem Influenzavirus - Grippevirus, Myxovirus influenzae - handelt es sich um ein ubiquitäres Orthomyxovirus als Erreger der echten Grippe. Eine aktive Immunisierung gegen Grippe - die Grippeschutzimpfung - erfolgt mit trivalentem Impfstoff aus inaktivierten, auf Hühnerbruteiern gezüchteten Grippeviren oder mit "Subunit"-Impfstoff, der nur noch Hämagglutinin und Neuraminidase des Virus enthält. Die Wirkungsdauer der
- 15 Grippeschutzimpfung beträgt ein Jahr (Roche-Lexikon Medizin, 3. Auflage - München, Wien, Baltimore - Urban & Schwarzenberg 1993; Lange, W. et al.: Influenza, Blackwell - Berlin - Wien 1999).

- Die gegenwärtig angewendeten Grippeimpfstoffe werden nach ihren Typen jährlich dem Epidemiegeschehen angepasst. Das heißt, es müssen pro Jahr jeweils neue Grippeimpfstoffe
- 20 produziert werden. Die lokale und allgemeine Verträglichkeit der inaktivierten Influenzaimpfstoffe ist sehr gut. Die Zielstellung der gegenwärtig durchgeführten Influenzaimpfstoffaktionen im Herbst besteht darin, einen ausreichend hohen Antikörperschutz gegen die zu erwartenden Epidemiestämme hervorzurufen.

- Dazu findet jährlich eine Sitzung von Influenzaexperten der Weltgesundheitsorganisation
- 25 WHO statt, bei der den Impfstoffherstellern die epidemiologisch relevanten Virusstämme für die kommende Saison empfohlen werden. Die WHO stellt den Herstellern das sogenannte Mastervirus zur Verfügung, aus dem dann über das Saatvirus der Impfstoff hergestellt wird (Lange, W. et al.: Influenza, Blackwell - Berlin - Wien 1999).

- Hersteller von Influenzaimpfstoffen in Europa sind die Unternehmen Pasteur Merieux MSD /
- 30 Aventis, Sächsisches Serumwerk Dresden/ SmithKline Beecham, Duphar, Chiron Behring und Solvay Arzneimittel.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Verfügung zu stellen, die zur Stimulation von T-Lymphozyten und zur Verwendung bei der Herstellung von Mitteln zur Immunstimulation geeignet sind. Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe durch die Verwendung von Proteinen aus Influenzaviren gelöst. Derartige Proteine sind z.B. in Influenzaimpfstoffen
5 enthalten.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Proteine aus Influenzaviren bei Gesunden, aber auch bei einem großen Teil HIV-Infizierter (HIV - Human Immunodeficiency Virus), in vitro zu starken Stimulationen der Lymphozyten führen und im Rahmen eines Lymphozyten-Stimulationstestes zur Ermittlung der Immunkompetenz von Patienten mit
10 Influenzaimpfstoff die höchsten Stimulationsquoten zu erzielen sind.

Zur Vertiefung und Erklärung dieses Befundes wurden daraufhin molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis der Genexpression für relevante Zytokine - Interleukin 2 (IL2), Interferon- γ (Gammainterferon, IFN- γ) TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) - durchgeführt. Dazu wurden im Markt gebräuchliche Immunstimulantien eingesetzt und mit der Wirkung
15 von Influenzaimpfstoff verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Influenzaimpfstoffe zur weitaus höchsten Stimulation der Genexpression für Zytokine führen.

Darüber hinaus war festzustellen, dass diese Zytokinexpression auch längere Zeit in der Kultur anhält, länger als bei jedem anderen untersuchten Immunstimulans.

Zu den Vergleichsstimulantien zählten Mistelpräparate, Echinacin, Thymusfaktoren und auch
20 ein bis jetzt nur für die Veterinärmedizin zugelassenes Präparat "Baypamun®", das aus attenuierten inaktivierten Pockenviren besteht (Baxevanis, C.N. u.a., Immunopharmacol. 20 (1998), 355-372; Stein, G.M., P.A. Berg, Arzneim.-Forsch. 46 (1996), 635-639; Büssing, A. u.a., Tumor Diagn. Ther. 16 (1995), 49-53; Mayr A. u.a., Tierärztl. Umschau 52 (1997), 3-11).

Erfindungsgemäß werden Influenzaproteine mehrfach appliziert und die jeweiligen Boostereffekte im Sinne einer unspezifischen Immunstimulation genutzt. Mit dieser Immunstimulation kommt es zu einer Verbesserung der Infekteresistenz - unabhängig vom Erregertyp - und zur Erhöhung der antitumoralen Reaktion bei Tumorträgern. Für Tumorträger ist dabei entscheidend, dass mit dem Impfstoff auch NK(natural killer)-Zellen
30 stimuliert und aktiviert werden. Ein weiterer Effekt besteht darin, dass eine erhöhte Syntheseaktivität für immunologisch wichtige Zytokine, wie Interleukin 2, Gammainterferon und TNF, induziert wird. Die Einsatzkonzeption für Influenzaimpfstoffe zur unspezifischen Immunstimulation umfasst

- Patienten mit häufigen Infekten, gleichbedeutend mit einer verminderten Infekteresistenz;
 - Patienten jenseits des 60. Lebensjahres, die erfahrungsgemäß häufiger eine verminderte Leistungsfähigkeit des T-lymphozytären Systems aufweisen - was sich besonders in einer stark verzögerten Rekonvaleszenzphase nach Infekten zeigt;
 - HIV-Patienten unter antiretroviraler Therapie. Dabei wird die sonst unter Immunstimulation befürchtete Verstärkung der HIV-Replikation durch die antiretrovirale Therapie unterdrückt. Die Immunstimulation dient der Aktivierung von HIV-reaktiven Effektorzellen, die HIV-replizierende Restzellen erkennen und eliminieren sollen;
 - Patienten nach schulmedizinischer Tumorthherapie ohne nachweisbare Metastasen zur Rezidivprophylaxe bzw. mit nachweisbaren Metastasen zur Erhöhung der antitumoralen Immunreaktivität.
- 15 Zum Wirkungsmechanismus der Influenzaproteine als Immunstimulans:
- Durch eine wiederholte Applikation des Impfstoffes werden Influenzavirus-spezifische T-Zellen aktiviert und vermehrt. Bei der Aktivierung werden T-Zell-Zytokine wie Interleukin 2 und Interferon gamma freigesetzt. Diese heben in der Umgebung befindliche T-Lymphozyten mit anderen Spezifitäten auf ein höheres Aktivitätsniveau, was besonders für T-Gedächtniszellen zutrifft. Damit wird eine verstärkte Reaktionsbereitschaft gegen andere Viren (HIV, Herpesviren, Hepatitisviren), mit denen der Patient bereits infiziert ist, bzw. exogene Erreger in der Umgebung des Patienten, erreicht.
- Dieser Effekt ist jedoch nur zu erzielen, wenn der Influenzaimpfstoff mehrfach appliziert wird. Dabei wird automatisch auch die spezifische Abwehr gegen Influenzavirus verstärkt, die heute mit dem Titeranstieg von Antikörpern gegen das Hämagglutinin des Virus nachgewiesen wird. Für die Anwendung des Immunstimulans ist es jedoch nicht notwendig, jährlich die Zusammensetzung der Impfstämme zu verändern.
- Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es überraschenderweise möglich, durch Verwendung von Influenzaimpfstoff (Grippeimpfstoff) die Aktivierung einer defizitären Immunabwehr zu erreichen.
- 30 Kontraindikationen für diese Maßnahme werden in folgenden Krankheiten gesehen:
- Autoimmunkrankheiten mit Betonung der zellvermittelten Immunität (z.B. Multiple Sklerose, chronische Autoimmunerkrankungen des Darmes wie Mb.

Crohn)

- Patienten nach allogener Gewebe- oder Organtransplantation wegen der Gefahr, eine Rejektionskrise zu induzieren.

Das Wesen der Erfindung liegt in der Verwendung eines bekannten Mittels zu einem neuen Zweck und in einer Kombination bekannter Elemente - der Influenzaimpfstoffe - und einer neuen Wirkung - ihrem Einsatz als Mittel zur unspezifischen Immunstimulation - die in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass nunmehr ein bewährtes und verbreitetes Arzneimittel als Mittel zur Stimulation von T-Lymphozyten bei einem funktionell gestörten Immunsystem zur Verfügung steht.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Es wurden von 30 klinisch gesunden Probanden (15 Männer, 15 Frauen - im Alter von 20 bis 55 Jahren) Blutproben entnommen, Immunzellen (Lymphozyten und Monozyten) daraus präpariert und zu je 2×10^5 Zellen in Mikrokulturen aliquotiert. Zu diesen Mikrokulturen wurden jeweils ein bekanntes Mitogen (Lektine, stimulierende monoklonale Antikörper, Superantigene) und in einer weiteren Reihe von Mikrokulturen Influenzaimpfstoff (Endverdünnung 1 : 1000 einer Impfdosis) hinzugefügt. Die Kulturen wurden in einem serumhaltigen Zellkulturmedium über 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert, 6 Stunden vor Abbruch mit ³H-Thymidin versetzt und das in die Zell-DNS eingebaute ³H-Thymidin mit einem Betacounter quantitativ bestimmt (counts per minute = cpm).

Die Positivkontrolle entspricht der Mitogen-stimulierten Kultur. Die Negativkontrolle enthält kein bekanntes oder potentiell Stimulans.

Das Ergebnis wird als Stimulationsindex (SI) ausgedrückt:

$$SI = \frac{\text{cpm (Testansatz)}}{\text{cpm (Negativkontrolle)}}$$

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	Mitogene -	PHA	SI	60 +/- 15
		AntiCD3	SI	70 +/- 20
		Enterotoxin B	SI	50 +/- 20
5	Immunstimulation			
		Echinacin	SI	< 3
		Mistellektine	SI	4 +/- 2,5
		Thymuspeptide	SI	6 +/- 3
	Influsplit-	Impfstoff 1	SI	38 +/-14
10	Influvac-	Impfstoff 2	SI	30 +/-12
	Begrivac-	Impfstoff 3	SI	28 +/-14.

Beispiel 2:

- 15 Bei Untersuchungen analog zu Beispiel 1 bei 40 HIV-infizierten Patienten wurden folgende Ergebnisse mit Influenzaimpfstoff erzielt:

Patienten im Stadium I und II

	Influsplit	SI	28 +/-13
--	------------	----	----------

20

Patienten im AIDS-Stadium

	Influsplit	SI	10 +/- 6
--	------------	----	----------

- 25 Unter einer antiretroviralen Therapie der HIV-Patienten wurde stets ein Anstieg des SI um mehr als 50% gemessen.

Beispiel 3:

- 30 Zur Absicherung der in Beispiel 1 und 2 mittels Lymphozytenstimulationstest dargestellten Aktivierung der T-Lymphozyten durch Influenzaimpfstoffe wurden bei 5 gesunden Probanden Blutproben entnommen, Immunzellen daraus isoliert und analog zu Beispiel 1 mit verschiedenen Immunstimulantien inkubiert. Nach 6 (Figur 1) und nach 20 Stunden (Figur 2) wurde aus den Zellen die mRNA (Messenger-Ribonucleinsäure) nach bekannten Verfahren

gewonnen und im TaqMan-System (Fa. Perkin-Elmer) auf den Gehalt an mRNA für Interleukin 2 (IL2), Interferon gamma (IFN-γ), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukin 10 (IL10) untersucht.

Die Figuren 1 und 2 zeigen Beispiele einer solchen Untersuchung.

- 5 Als Vergleichsstimulatoren wurden Echinacin, Baypamun und Candida neben den Influenzaimpfstoffen Influvac® und Influsplit® untersucht.

Das dargestellte Ergebnis E berechnet sich wie folgt:

$$E = 2^{-\Delta Ct}$$

- Der Ct-Wert (cycle threshold) stellt die PCR-Zykluszahl (PCR - polymerase chain reaction) dar, bei der das gemessene Signal des Zytokins (korreliert zur Menge des induzierten Zytokins) erstmals das 10-fache der Standardabweichung der Null-Linie (d.h. des Hintergrundrauschens) übersteigt, also ein eindeutiges Signal erkennbar ist.
- 10

Der ΔCt-Wert (delta cycle threshold) bedeutet: Ct-Wert des jeweiligen Zytokins - (minus) Ct-Wert eines House-Keeping Gens, z.B. HPRT (Hypoxantin-Ribosyl-Transferase).

- 15 Ein House-Keeping Gen ist das Gen eines Proteins, das durch Stimulanz selbst nicht reguliert wird, z.B. ein Strukturprotein aus der Zellwand. Das bedeutet, dass aus der Signalthöhe dieses Gens direkt auf die Gesamt-mRNA-Menge, letztlich die Gesamt-Zellzahl im Ansatz, geschlossen werden kann.

- Beide Influenzaimpfstoffe stimulieren die mRNA-Synthese für Interleukin 2 (T-Zellwachstumsfaktor), Interferon gamma (NK-Zellstimulator) und TNF-α (Phagozytenstimulator) ohne gleichzeitige Aktivierung des immunsuppressiv wirkenden Interleukin 10.
- 20

Damit wurde mit einer unabhängigen Methode die stark T-Lymphozyten-stimulierende Wirkung von Influenzaproteinen bestätigt.

Patentansprüche

1. Mittel zur Stimulation des Immunsystems, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Bestandteile Komponenten von Influenzaviren enthalten.

5

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponenten zur Stimulation von T-Lymphozyten Influenzaimpfstoffe enthalten.

10

3. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie mehrfach appliziert werden, um zu Effekten im Sinne einer unspezifischen Immunstimulation zu gelangen.

4. Verwendung von Komponenten von Influenzaviren zur Herstellung von Mitteln zur Immunstimulation.

15

5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die wirksamen Mittel im Sinne einer Immunstimulation auf den Gebieten Tumorthherapie oder HIV-Infektion unter antiretroviraler Therapie eingesetzt werden.

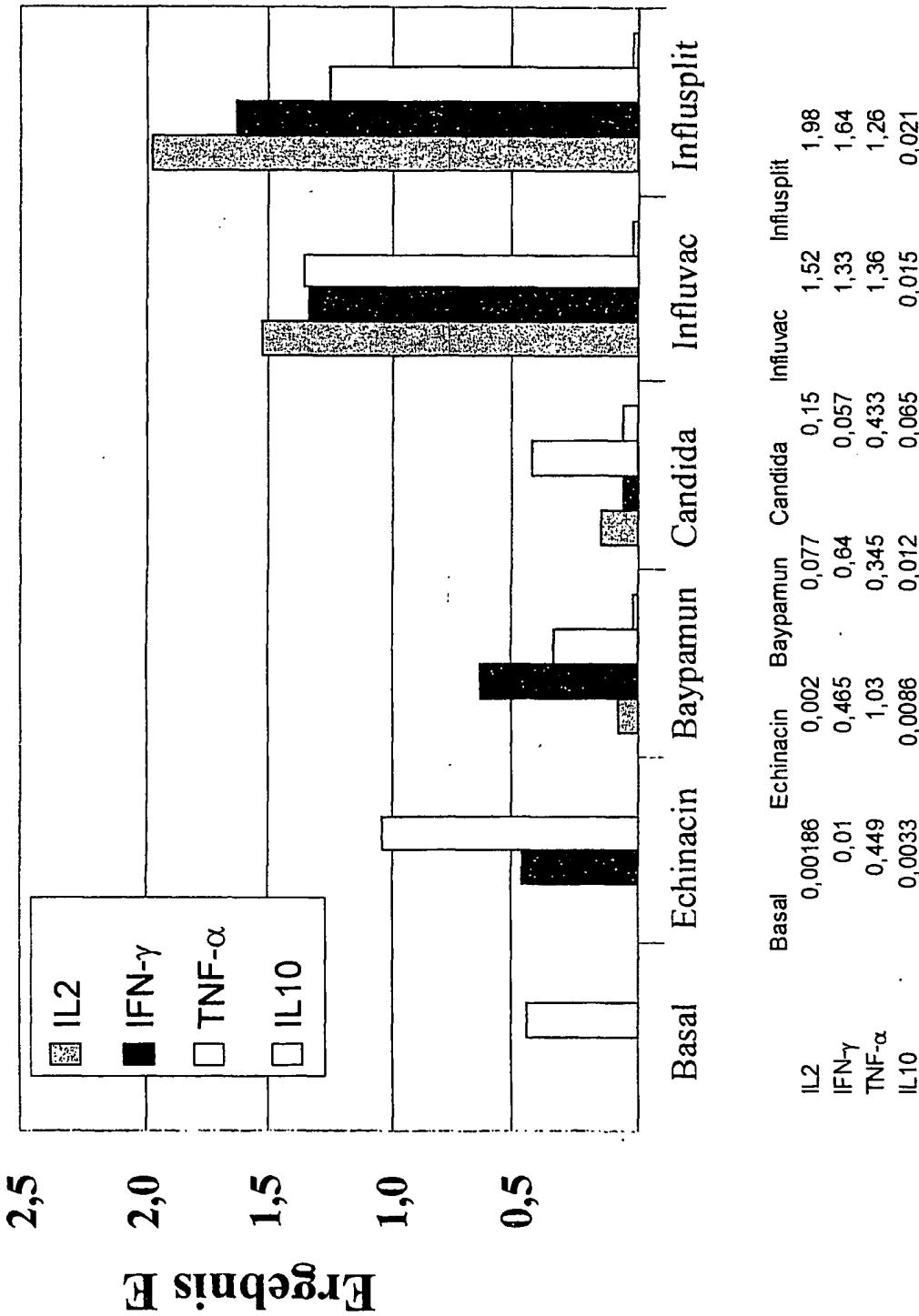
20

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel nach Anspruch 1 bis 3 eingesetzt werden zur Verbesserung der Infektoresistenz und zur Erhöhung der antitumoralen Reaktion bei Tumorträgern, zur Stimulierung und Aktivierung von NK-Zellen, zur Erhöhung der Syntheseaktivität für die immunologisch wichtigen Zytokine Interleukin 2, Gammainterferon und TNF- α sowie der Leistungsfähigkeit des T-lymphozytären Systems.

25

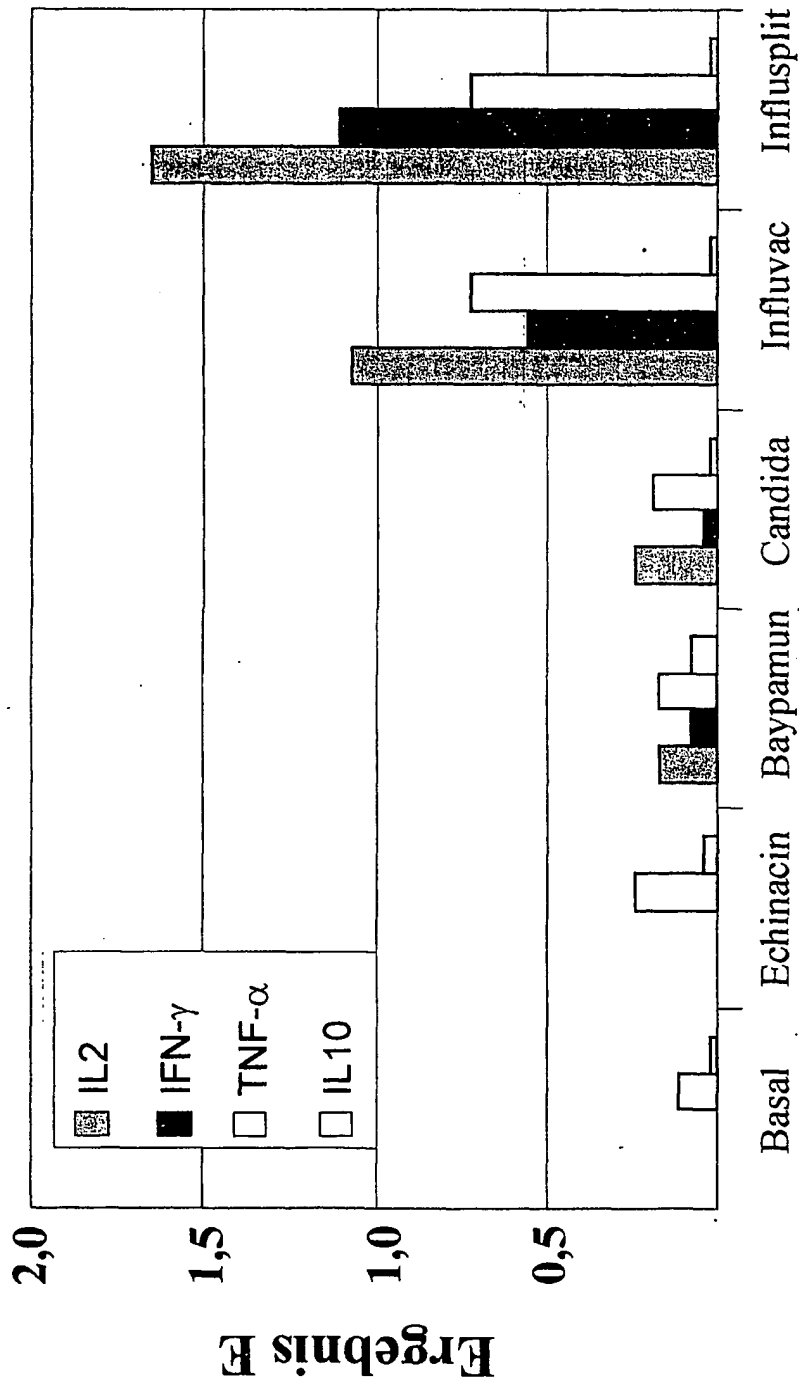
Figur 1

Induzierte mRNA nach 6 Stunden (TaqMan[®])



Induzierte mRNA nach 20 Stunden (TaqMan[®])

Figur 2



	Basal	Echinacin	Baypamun	Candida	Influvac	Influplit
IL2	0,0027	0,002	0,17	0,23	1,06	1,66
IFN- γ	0,0024	0,0073	0,078	0,039	0,55	1,1
TNF- α	0,11	0,23	0,16	0,177	0,71	0,71
IL10	0,017	0,04	0,076	0,026	0,012	0,021